

⑮ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ Offenlegungsschrift
⑩ DE 199 18 210 A 1

⑤ Int. Cl.7:
A 61 K 35/20
A 61 P 1/00

⑪ Aktenzeichen: 199 18 210.8
⑫ Anmeldetag: 22. 4. 1999
⑬ Offenlegungstag: 2. 11. 2000

⑦① Anmelder:
Biomun GmbH, 18059 Rostock, DE; Privates Institut
BioServ GmbH, 18059 Rostock, DE

⑦④ Vertreter:
Baumbach, F., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw.,
13125 Berlin

⑦② Erfinder:
Bange, Reinhard, Dr., 18057 Rostock, DE; Bange,
Volker, Dr., 18069 Rostock, DE; Heinrich,
Hans-Werner, Prof., 17498 Riemserort, DE; Meyer,
Udo, Dr.sc., 18239 Hastorf, DE; Tech, Egon, 18334
Bad Sülze, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- ⑤④ Verfahren zur Herstellung eines Milchpräparates mit verzögerter Inhaltsstoff-Freisetzung und seine Verwendung
- ⑤⑦ Die Erfindung beschreibt ein Verfahren zur Herstellung eines Milch-, Milchserum- oder Molkepräparates für die orale Anwendung mit verzögerter Freisetzung der Inhaltsstoffe. Es ist geeignet für die Prophylaxe oder Therapie von Darmentzündungen.

DE 199 18 210 A 1

BEST AVAILABLE COPY

DE 199 18 210 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Milch-, Milchserum- oder Molkepräparates für die orale Anwendung mit verzögerter Freisetzung der Inhaltsstoffe, das Milchpräparat an sich als solides Gel sowie seine Verwendung für die Prophylaxe oder Therapie von Darmentzündungen.

Milch ist nicht nur ein ausgewogenes Nahrungsmittel für neugeborene und junge Säugetiere, es enthält darüber hinaus viele Substanzen, die in pharmazeutischen und Zusammensetzungen für die Tiermedizin bedeutsam sind.

So sind verschiedene Verfahren zur Gewinnung von Immunglobulinen aus Milch oder Kolostrum bekannt. Es sind chromatographische Verfahren und Verfahren zur Herstellung von Proteinkonzentraten aus Milchserum beschrieben, wobei die Proteine durch eine Hitzebehandlung größtenteils denaturiert werden. Nach DE 34 32 718 erfolgt das Herstellen eines Immunglobulinpräparates aus Kolostrum nicht immunisierter Tiere unter Anwendung von Filtration und anschließender Tangentialzentrifugation. Darüber hinaus sind weitere Möglichkeiten der Gewinnung unterschiedlicher Milchserumpräparate bekannt. Im Ergebnis dieser Verfahren erhält man entweder ein flüssiges oder sprühgetrocknetes Präparat für verschiedenste Anwendungen, so zum Beispiel zur Behandlung bakterieller oder Toxin-bedingter Erkrankungen und Bekämpfung von Protozoen (EP-A 0 338 229) oder zur Hemmung von Entzündungen (EP-A 0 046 909, EP-A 0 064 103).

Aus WO 97/26898 ist ein magensaftresistentes Kolostrumpräparat zur Behandlung von Schlafstörungen bekannt. Dazu wird Kolostrum von Tieren als Flüssigkeit oder als Trockenprodukt (lyophilisiert oder sprühgetrocknet) mit magensaftresistenten Substanzen wie Eudragit® oder Aquateric® umhüllt.

Alle flüssigen bzw. zu resuspendierenden trockenen Präparate für die orale Anwendung, die nicht mit einer magensaftresistenten Hülle versehen sind, haben jedoch den Nachteil, daß sie während der Magen-Darm-Passage sehr rasch der Proteolyse unterliegen. Das Umhüllen mit Eudragit oder ähnlichen Substanzen, verteuert die Herstellung.

Viele Bestandteile der Milch sind entscheidend für die Auseinandersetzung des jungen Individuums mit der mikrobiologischen Umwelt. Zur Unterstützung des Abwehrsystems des Neugeborenen werden mit der Milch neben spezifischen Antikörpern auch unspezifisch wirkende Substanzen wie Lactoferrin, Lysozym, Komplementfaktoren, Properdin, Lactoperoxidase, Makrophagen, Mikrophagen, T- und B-Lymphozyten u. a. übertragen. Diese Faktoren wirken z. T. direkt bakterizid, unterstützen die unspezifische Abwehr oder gewährleisten die Weitergabe der immunologischen Erfahrung des Muttertieres.

Einen wesentlichen Anteil dieser Stoffgruppe bilden Immunglobuline (Ig), die im mütterlichen Organismus im Ergebnis einer spezifischen Abwehrreaktion gebildet werden. Sie werden wenige Wochen vor der Geburt selektiv in der Milchdrüse angereichert. Neben einem hohen Gehalt von Ig des Typs G (IgG) sind beträchtliche Mengen von sekretorischen IgA (sIgA) zu ermitteln. Dieses Ig spielt eine entscheidende Rolle für den Schutz von Schleimhäuten. Die Neugeborenen können maternale Antikörper während der ersten Lebensstunden aus dem Dünndarm resorbieren und sind so auch gegen systemisch verlaufende Infektionen geschützt. Trotz großer tierartlicher Unterschiede nimmt jedoch die Konzentration der Ig in der Milch innerhalb weniger Tage nach der Geburt rasch ab.

Aufgabe der Erfindung ist es deshalb, Milchpräparate zu entwickeln, mit denen auch nach Ende der ersten Lebenswoche die Neugeborenen mit hochwertigen kolostralen Schutzstoffen versorgt werden können, um so einen verbesserten Schutz vor Darminfektionen zu erreichen und den Aufbau einer eigenen belastbaren Immunität durch Auseinandersetzung mit der infektiösen Umwelt zu unterstützen. Es soll ferner ein einfaches Verfahren zur Herstellung von entsprechenden Milchpräparaten bereitgestellt werden. Das heißt, daß insbesondere Milchserum in einem Milchpräparat, nach Abtrennung der Caseinfraction, vor der Wirkung proteolytischer Verdauungsenzyme geschützt ist.

Diese Aufgabe wird gemäß den Ansprüchen realisiert. Erfindungsgemäß wird Kolostrum, vorzugsweise das Milchserum, mit Dickungs- und/oder Geliermitteln, insbesondere mit schwerverdaulichen Substanzen, geliert. In dem so hergestellten gelartigen Milchpräparat bleiben die kolostralen Schutzstoffe über einen langen Zeitraum (mehrere Wochen, mindestens 12) erhalten und werden bei Anwendung verzögert, d. h. erst während der Darm-Passage freigesetzt. Kolostrale Schutzstoffe sind im Sinne der Erfindung Proteine wie z. B. Lactalbumine, Lactoglobuline, insbesondere die sIgA, mütterliche Antikörper, Mineralsalze, Vitamine etc., ggf. auch die zur Milchsäuerung enthaltenen oder zugesetzten Milchsäurebakterien.

Vorzugsweise wird Kolostralmilch in einem ersten Schritt nach dem bekannten Verfahren der Milchsäuerung und Caseinfällung behandelt. Die Milch wird durch natürliche Säuerung, durch Beimpfen mit säurebildenden Mikroorganismen oder durch Zugabe von anorganischen Säuren, wie z. B. Salzsäure oder organischen Säuren, vorzugsweise Essigsäure auf einen pH-Wert von 4,0 bis 4,4, bevorzugt von 4,15–4,3 eingestellt. Durch Filtration oder Zentrifugation wird Milchserum/Molke von der Caseinfraction und den MilCHFetten getrennt. Das die schützenden Stoffe enthaltende Kolostrum oder das Milchserum wird mittels Verdickungs- und/oder Geliermitteln allein oder in unterschiedlichen Kombinationen bevorzugt bestehend aus Alginaten, Agar-Agar, Ligninen, Carragene, Cellulosen, Dextrane, Gummi arabicum, Pektine, Xanthangummi u. a., ganz besonders bevorzugt mit Agar-Agar vermischt. Dadurch werden die kolostralen Schutzstoffe nach dem Gelieren der Trägersubstanz in ein Netzwerk von fibrillären Molekülen eingeschlossen. Das resultierende Präparat ist ein Gel.

Bei Verwendung des erfindungsgemäßen Milchpräparates mit Milchserum/Molke, also nach Entfernung des Caseins vor dem Gelieren, wird eine Behandlung von Darmentzündungen bei bereits bestehender Dyspepsie begünstigt. Dieser Schritt ist dagegen nicht notwendig für den prophylaktischen Einsatz des Milchpräparates.

Die im Produkt enthaltenen bzw. zur Milchsäuerung zugesetzten Milchsäurebakterien wie Lactobacillus (L. acidophilus, L. gassneri, L. johnsonii, L. casei, L. reuteri u. a.) werden in das Gel schadloß eingeschlossen und bleiben für mehrere Wochen lebensfähig. Durch die verzögerte Freisetzung im Darm, bewirken diese Bakterien durch Adhäsion an die Darmepithelien, die Bildung antibakterieller Substanzen und die Immunmodulation des Immunsystems einen zusätzlichen probiotischen Effekt.

Das erfindungsgemäße Präparat wird vorzugsweise zur Prophylaxe oder Therapie von infektiösen Darmerkrankungen eingesetzt. Durch die verzögerte Freisetzung der kolostralen Schutzstoffe wird eine gleichmäßigere Verteilung unverdau-

ter, biologisch aktive Substanzen über den gesamten Verdauungstrakt erzielt. Neben der passiven Schutzwirkung unterstützt das Präparat den Aufbau einer belastbaren aktiven Immunität.

Es ist von hoher praktischer Bedeutung, die Phase des passiven Immunschutzes, insbesondere des Schutzes der Darmschleimhaut mit sIgA zu verlängern. So ist bekannt, daß insbesondere Kälber etwa ab dem 4./5. Lebenstag über keinen ausreichenden Schutz gegen virale und bakterielle Durchfallerreger verfügen. Mit dem erfindungsgemäße Milchpräparat war es möglich, diesen Schutz zu erhalten (vgl. Beispiel 2).

Ausführungsbeispiel 1

10 kg Kolostralmilch werden mit Essigsäure auf einen pH von 4,3 angesäuert. In einem Zentrifugationsschritt werden die Caseinfraction und die Milchfette von der die Immunglobuline enthaltenden Proteinfraction (7-8,5 kg) getrennt. Diese Fraction wird auf 42°C erwärmt. Vorher wurde eine 10%ige Agarlösung in Wasser hergestellt und durch Erhitzen auf 100°C vollständig gelöst. Die Agarlösung wird auf 45°C abgekühlt und erfindungsgemäß in das Milchserum bis auf eine Endkonzentration von 1,2-1,4% untergemischt. Nach dem Erkalten entsteht ein festes Präparat, daß zur besseren Dosierung mechanisch grob zerkleinert wird. Dieses Agar-Milchserum-Gemisch wird z. B. mit der Tränkmilch verfüttert.

Ausführungsbeispiel 2

Eine Gruppe von 13 Kälbern erhielt am 3. und 5. Lebenstag je eine 50 g Portion Agar-Milchserum-Gemisch mit einer Ration Tränkmilch verfüttert. Im Vergleich zu einer nur mit Tränkmilch versorgten Kontrollgruppe wurden wesentliche Gesundheitsparameter ermittelt und miteinander verglichen.

Anzahl	mit Präparat n=13	Ohne Präparat n=13	Gesundheitsparameter Im Vergleich zur Kontrolle Verbesserung um:
--------	-------------------------	--------------------------	---

Krankheitstage insgesamt	40	106	62%
Behandlungen insgesamt	6	39	85%
Schwer erkrankte Kälber	4	11	64%
Nicht erkrankte Kälber	4	0	

Es wurde eine deutliche Abnahme der Durchfallerkrankungen, der Intensität der Erkrankungen, der Dauer der Erkrankungen und der Anzahl der notwendigen Behandlungen beobachtet.

Ausführungsbeispiel 3

10 l Kolostum werden nach Beimpfen mit von *L. acidophilus* für 48 h bei 37°C inkubiert. Durch diese Fermentation wurde der pH-Wert auf 4,3 abgesenkt. Das Milchserum wurde durch Zentrifugation von der Caseinfraction abgetrennt. Das Milchserum wird auf 37°C temperiert und im Durchflußverfahren intensiv mit der 45°C warmen Agarlösung vermischt (Agar-Endkonzentration 1,2%). Die kurzzeitige Temperaturerhöhung hat keinen Einfluß auf die Vermehrungsfähigkeit der Mikroorganismen. Das Gel wird in 50 ml Portionen in verschweißbare Polypropylenschläuche abgefüllt. Während der Lagerung von 8 Wochen bei 4°C war keine Reduktion des Gehaltes von *L. acidophilus* festzustellen.

Je 50 ml dieses Präparates wurden 15 Kälbern in konventioneller Haltung am 3. und 5. Lebenstag mit einer Ration Tränkmilch verfüttert. Im Vergleich zu einer nur mit Tränkmilch versorgten Kontrollgruppe wurden wesentliche Gesundheitsparameter ermittelt und miteinander verglichen.

Anzahl	Mit Präparat n=15	Ohne Präparat n=15	Gesundheitsparameter Im Vergleich zur Kontrolle Verbesserung um:
--------	-------------------------	--------------------------	---

Krankheitstage insgesamt	41	113	64%
Behandlungen insgesamt	9	53	83%
Schwer erkrankte Kälber	3	10	70%
Nicht erkrankte Kälber	6	0	

Es wurde eine deutliche Abnahme der Durchfallerkrankungen, der Intensität der Erkrankungen, der Dauer der Erkrankungen und der Anzahl der notwendigen Behandlungen beobachtet.

Patentansprüche

- Verfahren zur Herstellung eines gelartigen Milchpräparates mit hohem Anteil an kolostralen Schutzstoffen durch Versetzen von Kolostrum (Kolostralmilch) oder daraus gewonnenem Milchserum mit Dickungs- und/oder Geliermitteln.
- Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Gewinnung des Milchserums das Kolostrum säuert und die Milchserum/Molke-Fraktion von der Caseinfraktion und den Milchfetten nach an sich üblichen Methoden abtrennt.
- Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Säuerung der Kolostralmilch natürlich, durch Beimpfen mit säurebildenden Mikroorganismen oder durch Zugabe anorganischer oder organischer Säuren, wie Salzsäure oder Essigsäure, auf einen pH-Wert von 4,0 bis 4,4, vorzugsweise 4,15 bis 4,3, erfolgt.
- Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man aus Dickungs- und/oder Geliermitteln, ggf. unter Erhitzen, eine wäßrige Lösung herstellt und diese Lösung der Kolostralmilch oder dem Milchserum untermischt.
- Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Dickungs- und/oder Geliermittellösung bis auf eine Endkonzentration von 1,0 bis 1,5%, vorzugsweise 1,2 bis 1,4%, untergemischt wird.
- Verfahren nach Anspruch 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß als Dickungs- und/oder Geliermittel schwerverdauliche Substanzen allein oder in Kombination eingesetzt werden.
- Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß als Dickungs- und/oder Geliermittel Agar-Agar, Alginate, Lignine, Carragene, Cellulosen, Dextrane, Gummi arabicum, Pektine und/oder Xanthangummi, vorzugsweise Agar-Agar, eingesetzt werden.
- Milchpräparat mit hohem Anteil an kolostralen Schutzstoffen umfassend Kolostralmilch oder daraus gewonnenes Milchserum bzw. Molke sowie Dickungs- und/oder Geliermittel in einer Konzentration von 1,0 bis 1,5% als solides Gel, das eine verzögerte Inhaltsstoff-Freisetzung aufweist.
- Milchpräparat nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß als Dickungs- und/oder Geliermittel schwerverdauliche Substanzen allein oder in Kombination enthalten sind.
- Milchpräparat nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß als Dickungs- und/oder Geliermittel Agar-Agar, Alginate, Lignine, Carragene, Cellulosen, Dextrane, Gummi arabicum, Pektine und/oder Xanthangummi, vorzugsweise Agar-Agar, enthalten ist.
- Milchpräparat nach Anspruch 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß natürliche und ggf. künstlich zugesetzte Mikroorganismen enthalten sind.
- Verwendung eines Milchpräparates nach Anspruch 8 bis 11 zur oralen Prophylaxe und/oder Therapie von Entzündungen des Verdauungssystems insbesondere des Darmkanals bei Menschen und Tieren.